



Биол. журн. Армении, 4 (67), 2015

ВЛИЯНИЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ НА АЗОТИСТЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В СЕЛЕЗЁНКЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ГЕПАТИТЕ

П.Н. САВИЛОВ

ТОГБУЗ “Тамбовская ЦРБ”, с. П.Пригородное, Россия
Воронежский государственный медицинский университет, Воронеж, Россия
p_savilov@rambler.ru

В опытах на 85 крысах самках 180-220 г исследовали влияние резекции печени (РП, 15% от массы органа) на азотистый метаболизм в селезёнке животных с хроническим тетра-хлорметановым гепатитом (CCl₄, 50% раствора CCl₄ на оливковом масле (0,1 мл /100 г мас-сы) через сутки с двумя двухнедельными перерывами между 6-7- и 13-14 инъекциями). Ис-следованиями установлено, что РП усиливает нарушения азотистого метаболизма в селезён-ке, возникающие в процессе развития хронического CCl₄-гепатита. Это проявляется патоло-гическим накоплением в ней аммиака и глутамина спленоцитами при истощении внутрикле-точных реакций его связывания. Стимуляция образования спленоцитами мочевины на 3-и и 7-е сутки послеоперационного периода прекращается к 14-м сут после РП и сопровождается снижением концентрации мочевины в спленоцитах, несмотря на её повышенное поступ-ление к ним с артериальной кровью

Резекция печени – гепатит – селезёнка – аммиак – обмен

180-220 գ քաշով 85 էգ առնետների վրա կատարված փորձերում հետազոտվել է լյարդի ռեզեկցիան (ԼՐ, օրգանի զանգվածի 15%) քրոնիկ տետրաքլորմեթան հեպատիտով (CCl₄, CCl₄-ի 50 %-անոց լուծույթ ձիթապտղի յուղով (0,1 մլ/100 գ զանգվածի վրա) կենդանիների փայծաղում ազոտի նյութափոխանակության վրա՝ օրը մեջ. երկշաբաթական ընդմիջումներով 6-7 և 13-14 ներար-կումների միջև: Հետազոտությունները հաստատեցին, որ ԼՐ ուժեղացնում է փայծաղում ազոտի նյութափոխանակության խախտումները, որոնք առաջանում են քրոնիկ CCl₄-ի հեպատիտի զարգացման արդյունքում: Այն արտահայտվում է իր մեջ ամոնիակի և գլուտամինի պաթոլոգիկ կուտակմամբ՝ սպլենոցիտներով կապման ներբջջային ռեակցիաների հյուսվածքում ընթացքում: Միզանյութի ձևավորման խթանումը սպլենոցիտներով հետվիրահատական շրջանի 3-րդ և 4-րդ օրերին դադարեցվում է ԼՐ-ից հետո 14-րդ օրը և ուղեկցվում է սպլենոցիտներում միզանյութի խտության նվազմամբ՝ անկախ վերջինիս ավելացող մուտքից դրանց մոտ զարկերակային արյան հետ:

Լյարդի ռեզեկցիա – հեպատիտ – փայծաղ – ամոնիակ – նյութափոխանակության

The influence of liver resection (LR, 15-20 % ,by weight of the organ) on nitrogen metabolism in the spleen of animals with chronic tetrachlorcarbon hepatitis was investigated. It was shown that LR disorders of nitrogen metabolism in the spleen arising the process of develop-ment of chronic CCl₄-hepatitis. This is manifested by abnormal accumulation of ammonia and glu-

tamine by splenocyte during the depletion on its intracellular binding reactions. Stimulation of urea formation by splenocyte on the 3rd and 7th day of the postoperative period was interrupted on 14 days after LR and is accompanied by a decrease in urea concentration in splenocyte, in spite of their increased entrance with arterial blood.

Spleen – ammonium – glutamine – urea – hepatitis – liver resection

В процессе развития хронического гепатита не только нарушается обезвреживание аммиака в гепатоцитах [9], но и азотистый метаболизм в спленоцитах [15], принимающих активное участие в повреждении печени после прекращения действия на него патогенного агента [22]. Одним из способов хирургического лечения хронических гепатитов и циррозов печени является резекция печени (РП) [7]. Её применение основано на стимуляции репаративных процессов в поражённом органе и запуске резорбции избытка соединительной ткани, образующейся при данной патологии [18]. Между тем известно, что РП на фоне хронического гепатита усиливает развивающиеся при данной патологии [4] нарушения аммиако-безвреживающей способности гепатоцитов [8]. В результате прогрессирует эндогенная аммиачная интоксикация [11], однако состояние азотистого метаболизма в спленоцитах после РП на фоне хронического гепатита не исследовано.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния РП на азотистый метаболизм спленоцитов при хроническом тетрахлорметановом гепатите.

Материал и методика. Опыты проведены на 85 беспородных половозрелых белых крысах (самках) массой 180-220 г. Хронический гепатит воспроизводили путём подкожного введения 50 %-ного раствора CCl_4 на оливковом масле (0,1 мл / 100 г массы) через сутки с двумя двухнедельными перерывами (между 6-7- и 13-14 инъекциями) [16]. РП осуществляли путём удаления части левой доли печени (15 % -20 % от массы органа) под эфирным наркозом на 65-е сут развития CCl_4 -гепатита сразу после последней инъекции токсина. Животные были разделены на 5 серий опытов: 1 – интактные животные (норма), 2 – животные, исследованные на 65-е сутки введения CCl_4 (конец затравки), 3, 4, 5 – животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные, соответственно, на 3-и, 7-е и 14-е сут после лапаротомии и отмены CCl_4 . Эти серии служили контролем для выявления “чистого” эффекта РП. 6,7 и 8 серии- животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные, соответственно, на 3-и, 7-е и 14-е сутки после РП. Забой животных проводился на фоне этилового наркоза (40 мг этилового Na /кг массы). Для определения азотистых метаболитов селезёнку замораживали в жидком азоте и растирали до порошка, который использовали для приготовления 10% гомогената в 60%-ном растворе трихлоруксусной кислоты. Гомогенат экстрагировали на холоде в течение 30 мин, затем его центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Полученный супернатант использовали для определения аммиака, глутамина и мочевины. Артериальную кровь (АК) для исследования брали предварительно гепаринизированными инсулиновыми шприцами из аорты. Объектом исследования служила депротеинизированная плазма крови. Содержание аммиака в ткани селезёнки определяли микродиффузионным методом [17], в крови – фенилгипохлоридным методом [21]. Содержание глутамина в почках и крови определяли методом кислотного гидролиза [20]. Содержание мочевины в селезёнке и крови – диацетилмоноксидным методом [23]. Содержание метаболитов в селезёнке выражали в ммоль/кг влажной ткани, в крови – в ммоль/л. Результаты обработаны статистически с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл.1, на 65-е сут после РП концентрация аммиака в АК в конце затравки превышала норму на 90%. Это указывает на то, что РП у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом проводилась на фоне развития артериальной гипераммониемии. На 3-и сут после РП концентрация аммиака в АК увеличивалась на 14% по сравнению с концом затравки, на 7-е сут не отличалась от неё, а на 14-е сут снижалась на 14% (табл.1). Однако по сравнению с нормой она оставалась достоверно повышенной во все дни наблюдений (табл.1).

Таблица 1. Содержание азотистых метаболитов в селезёнке (ммоль/кг влажной ткани) и артериальной крови (ммоль/л) после резекции печени на фоне хронического CCl₄-гепатита, $M \pm m$

Метаболиты	Норма, n=15	65-сут введения CCl ₄ , конец заправки, n=10	Сутки после резекции печени		
			3 (n=10)	7 (n=10)	14 (n=10)
Селезёнка					
Аммиак	1,67 ± 0,12	2,91±0,15*	3,23±0,11 [▲] *	2,09±0,18	5,1±0,55*
Глутамин	2,17 ± 0,13	1,99±0,23	3,66 ± 0,39* [▲]	2,12±0,17	3,35±0,36* [▲]
Мочевина	3,31 ± 0,16	3,96±0,25	6,75±0,33* [▲]	8,06± 0,43* [▲]	4,94±0,51* [▲]
Артериальная кровь					
Аммиак	0,098±0,006	0,186±0,008*	0,212±0,01* [▲]	0,186±0,019*	0,160±0,01* [▲]
Глутамин	0,710±0,021	0,585±0,023*	0,691±0,019 [▲]	0,735±0,03 [▲]	0,815±0,034* [▲]
Мочевина	3,4 ± 0,12	7,11±0,36*	5,48±0,2* [▲]	6,82±0,41*	6,78±0,43*

* (p<0,05) – достоверность различий по сравнению с нормой; [▲](p<0,05) – достоверность различий по сравнению с концом затравки. n- число животных по сериям опытов

Относительно “ложнооперированных” животных увеличение концентрации аммиака в АК на 3-и, 7-е и 14 сут после РП составило соответственно 27 %, 28 % и 25 % (рис.1). Если учесть, что повышенная концентрация аммиака в АК сохраняется в течение 14 сут после прекращения 65-дневного воздействия на организм малыми дозами CCl₄ [13], то можно говорить о синергизме влияния РП и CCl₄ на развитие артериальной гипераммониемии. Причиной тому не только прогрессирующее нарушение обезвреживания аммиака в печени, выявленное после её резекции на фоне гепатита [8], но и нарушение аммиакэксcretирующей функции почек оперированного организма [5].

Если у здоровых животных с РП послеоперационная артериальная гипераммониемия не сопровождалась накоплением аммиака в селезёнке [14], то длительное действие на организм CCl₄ вызывало увеличение его концентрации в спленоцитах, которое не нормализовалось к 14-м сут после отмены токсина [15]. РП на фоне хронического CCl₄-гепатита оказывала неоднозначное влияние на содержание аммиака в селезёнке. Если относительно конца затравки, достоверное (на 92 %) увеличение концентрации аммиака в селезёнке отмечено только на 14-е сут после РП, то по сравнению с нормой её увеличение наблюдалось 3-и и 14-е сут, соответственно на 93 % и 265 % (табл.1). Это по срокам совпадало с непосредственным стимулирующим влиянием РП на накопление спленоцитами аммиака (рис.1, А, В). Между тем на 7-е сут после РП обнаружено отсроченное ингибирующее влияние РП на накопление аммиака спленоцитами (рис.1, Б), в результате чего происходила кратковременная нормализация его концентрации в селезёнке (табл.1). Сопоставление полученных результатов указывает на то, что РП на фоне хронического CCl₄ –гепатита усугубляет нарушения азотистого метаболизма в спленоцитах, вызванные длительным действием на организм CCl₄, что проявляется активацией в них аммиониогенеза в раннем (3-и сут) и позднем (14 сут) послеоперационном периоде. В пользу этого указывает несоответствие прироста концентрации аммиака в АК и селезёнке, выявленное в указанные сроки исследования (рис.1, А,В). Что касается нормализации содержания аммиака в селезёнке на фоне артериальной гипераммониемии (7-е сут), есть все основания говорить о сопряженной с РП активации в указанный период реакций нейтрализации аммиака в спленоцитах, благодаря чему его концентрация в них снижается, несмотря на увеличение его поступления к ним с АК.

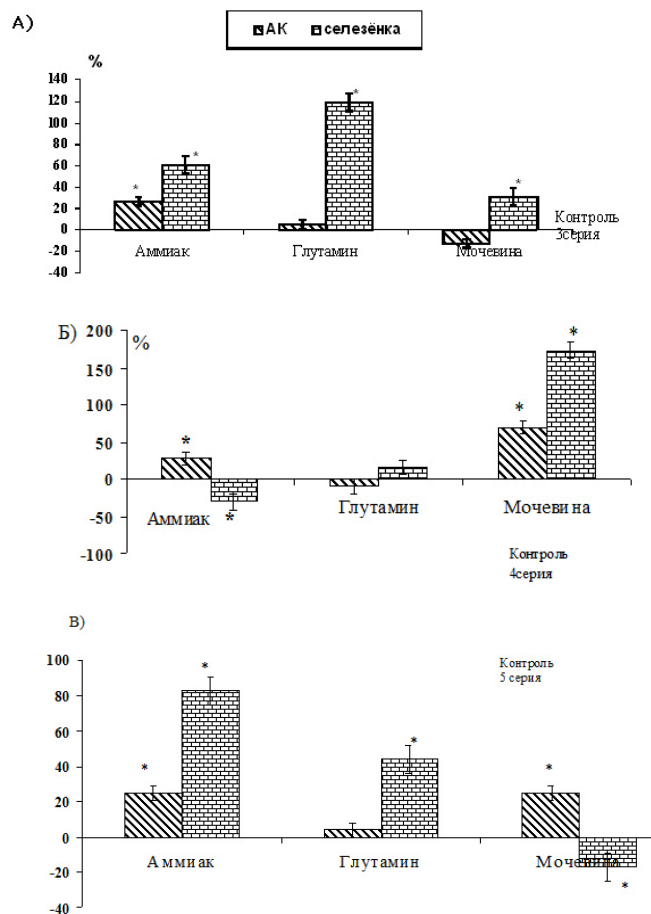


Рис.1. Динамика содержания азотистых метаболитов в селезёнке животных с хроническим CCl_4 -гепатитом на 3-и (А), 7-е (Б) и 14-е (В) сут после резекции печени.

* ($p < 0,05$) – достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем.

Контроль □ “ложнооперированные” животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные соответственно на 3-и (3 серия), 7-е (4 серия) и 14-е (5 серия) сут после отмены CCl_4 и лапаротомии. В сериях опытов □ по 10 животных.

Внутриклеточное содержание аммиака определяется не только соотношением метаболических реакций его образования и связывания, но и скоростью обмена аммиака между клеткой и окружающей средой [3]. Важная роль в кинетике аммиака отводится состоянию органного или тканевого кровотока [24]. Что касается селезёнки, то особенностью её гемодинамики является зависимость от давления в воротной вене [6]. В настоящее время установлено, что после резекции здоровой печени [25], как и при её хроническом диффузном поражении [16] происходит развитие портальной гипертензии. Поэтому есть все основания ожидать её прогрессирования после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита и как следствие нарушение оттока крови из селезёнки, которое будет содействовать накоплению в ней аммиака, особенно на 14-е сут послеоперационного периода. Портальную гипертензию можно рассматривать как одну из причин накопления селезёнкой глутамина, обнаруженного на 3-и и 14-сут после РП на фоне отсутствия в указанные сроки увеличения его содержания в АК (рис. А,В).

Глутамин не только является обратимой формой связывания аммиака в клетках млекопитающих [3], но и транспортной формой глутамата, который, как известно [2], плохо проходит через плазматическую мембрану. В клетке глутамин подвергается дезамидированию при участии глутаминаз, в результате чего высвобождается глутамат и аммиак [3]. Глутамат прямо и опосредованно вовлекается в многочисленные биохимические реакции, тогда как аммиак либо выводится из клетки, либо нейтрализуется в ней с образованием “собственного” глутамина при участии глутаминсинтетазы [3].

В организме млекопитающих одним из основных органов, определяющих концентрацию глутамина в АК, является печень [12]. РП усиливает нарушение глутаминообразовательной функции гепатоцитов, вызванное поражением печени CCl_4 [8]. Если прибавить к этому снижение инкреции глутамина из оперированной печени в кровоток [10], то вправе ожидать развития после резекции поражённой CCl_4 печени артериальной гипоглутаминемии. Однако как показали наши исследования (табл.), в этом случае наблюдается постепенное восстановление сниженной перед операцией концентрации глутамина в АК с отсроченным развитием на 14-е сут послеоперационного периода артериальной гиперглутаминемии. При этом, в отличие от влияния на концентрацию аммиака, непосредственного влияния на изменение концентрации глутамина в АК резекция печени не оказывала (рис.). Следовательно, устранение артериальной гипоглутаминемии после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита обусловлено исключительно прекращением действия гепатотоксина, а не запуском адаптивных внепечёночных механизмов глутаминообразования, обнаруженного у здоровых животных после РП [12].

В отличие от АК, на 3-и и 14-е сут после РП отмечено увеличение концентрации глутамина в селезёнке относительно “ложнооперированных” животных контрольных серий опытов, соответственно на 119 % и 43 % (рис. А,В). В результате она становилась достоверно выше соответствующего показателя нормы и конца затравки (табл.). Между тем, сопоставление полученных результатов, с данными литературы [14, 15] позволяет говорить о разных механизмах, лежащих в основе накопления глутамина спленоцитами на 3-и и 14-е сут после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита. В первом случае следует говорить о стимуляции образования глутамина спленоцитами, тогда как во втором речь должна идти о преимущественном накоплении ими “артериального” глутамина на фоне торможения образования “селезёночного” глутамина. Неслучайно столь выраженное накопление в этот период спленоцитами аммиака происходит на фоне снижения степени артериальной гипераммониемии и отсроченного развития артериальной гиперглутаминемии (табл. 1). Что касается кратковременной нормализации содержания глутамина и аммиака в селезёнке на 7-е сут после РП у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом, то это можно объяснить стимуляцией образования глутамина спленоцитами и его инкрецией в портальный кровоток. В свою очередь несоответствие прироста содержания аммиака в АК и селезёнке (рис. 1, А), выявленные на 3-и сут после РП на фоне отсутствия артериальной гиперглутаминемии (табл. 1) свидетельствует об активации в данный период дезаминирования в спленоцитах не глутамина, а других аминокислот.

Как видно из рис. 1 А, содержание мочевины в АК на 3-и сут после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита достоверно не отличалось от аналогичного показателя “ложнооперированных” крыс контрольной серии опытов. Однако на 7-е и 14-е сут оно превышало её, соответственно на 64 % и 25 % (рис. Б,В). По сравнению с нормой концентрация мочевины в АК была увеличена на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного периода, соответственно на 61 %, 100 % и 99 %, тогда как относительно конца затравки она снижалась на 23 % к 3-м сут послеоперационного

периода и в дальнейшем возвращаясь к предоперационному уровню (табл.1). Поскольку РП на фоне хронического гепатита нарушает мочевинообразование в печени [8], то выявленные изменения следует рассматривать как результат запуска внепечёночных механизмов, детерминирующих изменение концентрации мочевины в АК. Одним из них может служить увеличение её реабсорбции в почках, обнаруженное в указанные сроки послеоперационного периода у животных с РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита [4].

Отсутствие изменения концентрации мочевины в АК на 3-и сут после РП у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом сопровождалось увеличением на 30 % её содержания в селезёнке (рис.1, А). На 7-е сут исследования увеличение концентрации мочевины в последней составило 173 %, при этом прирост концентрации метаболита в селезёнке превосходил аналогичные её изменения в АК (рис.1, Б). На 14-е сут после РП на фоне сохранения стимулирующего влияния операции на увеличение концентрации мочевины в АК происходило её снижение на 17% в спленоцитах (рис.1, В). Полученные результаты указывают на различные механизмы, детерминирующие кинетику мочевины в селезёнке после резекции поражённой CCl_4 печени. Так, накопление мочевины в селезёнке на 3-и сут после РП следует рассматривать как результат стимуляции её образования спленоцитами, поскольку установлено стимулирующее влияние РП на активность в спленоцитах аргиназы [19], катализирующей образование мочевины из аргинина. Данный биологический эффект, видимо, сохраняется на 7-е сут послеоперационного периода, несмотря на увеличение в этот период поступления в спленоциты мочевины с АК (рис.1, В). Однако на 14-е сут послеоперационного периода стимулирующее влияние РП на активность аргиназы спленоцитов прекращается. Можно предположить, что одновременно с этим в спленоцитах активируется переход части “артериальной” мочевины из свободного в связанное состояние, что является одним из универсальных механизмов адаптации организма при патологии, сопровождающейся активацией ПОЛ [1]. Этим, на наш взгляд, и объясняется снижение концентрации мочевины в селезёнке на фоне её повышенной концентрации в АК (рис.1, В).

Таким образом, применение РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита вызывает дальнейшие нарушения азотистого метаболизма в спленоцитах, обусловленные длительным действием на организм гепатотоксина. Это сопровождается патологическим накоплением селезёнкой эндогенного токсина аммиака на фоне истощения в них внутриклеточных реакций его связывания, в том числе через образование “селезёночного” глутамина. По мере развития послеоперационного периода стимулирующее влияние РП на накопление мочевины прекращается и происходит снижение её содержания в спленоцитах, несмотря на сохранение её повышенного поступления к ним с АК.

Считаю своим долгом выразить глубокую признательность моему учителю профессору кафедры нормальной физиологии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко Виктору Николаевичу Яковлеву за возможность проведения исследований в его лаборатории с 1997 по 2003 г.г. и ценные советы при обсуждении полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершенович З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И. Мочевина в живых организмах. Ростов н/Д, РГУ, 1970

2. *Западнюк В.И., Купраш Л.Г., Заика М.У. Безверхая И.С.* Аминокислоты в медицине Киев,Здоров'я,1982.
3. *Косенко Е.А., Каминский Ю.Г.* Клеточные механизмы токсичности аммиака. М., Изд-во ЛКИ, 2008.
4. *Молчанов Д.В.* Кинетика азотистых метаболитов в почках при частичной гепатэктомии, хроническом гепатите и гипербарической оксигенации. Дисс. канд мед наук, ВГМА Воронеж, 2010.
5. *Молчанов Д.В., Савилов П.Н.* Почечные механизмы элиминации аммиака при резекции печени (экспериментальное исследование). Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии, 3, 3,64-68, 2013.
6. *Пациора М.Д.* Хирургическое лечение портальной гипертензии. М.:Медицина, 1974.
7. *Пышкин С.А., Малышев Ю.И., Димов П.Г.* Показания к хирургическому лечению хронического гепатита и цирроза печени. Клиническая хирургия, 9, 29-32,1986
8. *Савилов П.Н., В.Н. Яковлев В.Н., Леонов А.Н.* Роль гипербарической оксигенации в механизмах детоксикации аммиака при резекции печени на фоне хронического гепатита. Анестезиология и реаниматология, 6, 31-34, 1994.
9. *Савилов П.Н.* Состояние аммиакобезвреживающей функции печени при хроническом активном гепатите. Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1, 24-26, 2004.
10. *Савилов П.Н.* Глутаминовый цикл печени после её резекции. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии, 7, 53-58, 2010.
11. *Савилов П.Н., Молчанов Д.В.* Кинетика аммиака в организме при хроническом гепатите частичной гепатэктомии и гипербарической оксигенации. Журнал теоретической и практической медицины Воронеж, 8, 2, 211-216, 2010.
12. *Савилов П.Н., Молчанов Д.В., Яковлев В.Н.* Влияние гипербарической оксигенации на кинетику глутамин в организме при печёночной недостаточности Общая реаниматология 8, 2, 20-27, 2012.
13. *Савилов П.Н., Молчанов Д.В.* Кинетика азотистых метаболитов в почках при хроническом тетрахлорметановом гепатите. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2, 56-60, 2014
14. *Савилов П.Н.* Азотистый метаболизм селезёнки при резекции печени и гипербарической оксигенации. Биологический журнал Армении, 66,2, 6-17, 2014.
15. *Савилов П.Н.* Азотистый метаболизм в селезёнке при хроническом тетрахлорметановом гепатите. Биолог. журн. Армении, 67, 2, 36-41, 2015.
16. *Саркисов Д.С., Рубецкой Л.С.* Пути восстановления цирротически изменённой печени М., Медицина.1965
17. *Силакова А.И., Трубин Г.П., Явликова А.И.* Микрометод определения аммиака и глутамин в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопросы медицинской химии, 8, 5, 538-544, 1962.
18. *Солопаев Б.П.* Регенерация нормальной и патологически изменённой печени. Горький: Верхне-Волжск. Изд-во,1980.
19. *Чернышнёва М.Д., Малыгин А.М., Фель В.Я.* Индукция аргиназной активности в спленоцитах мышей СЗНА при частичной гепатэктомии. Цитология, 27, 2, 209-212, 1985.
20. *Harris M.* Studies regenerating a glutamine-like substance in blood and spinal fluid, including a method for its quantitative determination J. Clin. Invest., 22,4,569 – 576,1943.
21. *Keller H., Muller-Beisenritz, M., Neumann E.* Eine Methode zur Ammoniakbestimmung in Capillarblut Klin. Wsch.,15, 314-319, 1967.
22. *Pincard R.N., Weir D.M.* Antibodies against mitochondrial fraction of lever after toxic liver damage rats Clin.Exper. Immunol., 1, 33-43, 1966.
23. *Richterrich D.* Clinical. Chemistry -N.Y.: Academia Press, 1962.
24. *Savilov P.N., Yakovlev V.N.* Hyperbaric oxygenation and partial hepatectomy effects on liver bloodstream, oxygen pressure and ammonia detoxication in the liver under chronic hepatitis. Jugosl. Physiol. Pharmacol. Acta, 42, 32,103-114, 2006.
25. *Ungvary J., Bars T, Hunda P.A.* Regeneration of the hepatic arterial system after partial hepatectomy. Acta. Morf. Hung,23, 3-4, 275-282, 1977.

Поступила 03.09.2015